



Title	葉緑体ゲノムの形質転換
Author(s)	皆川, 純
Description	5章 形質転換 2. クラミドモナス b
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 591-595
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39198
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-082.pdf



2. クラミドモナス

b. 葉緑体ゲノムの形質転換

皆川 純¹⁾

1989年に行われた最初の葉緑体形質転換では単細胞緑藻のクラミドモナスが使われた。その後、形質転換の手法には工夫が重ねられ、またいくつかの選択マーカー、発現マーカーが開発された。クラミドモナス葉緑体形質転換の歴史的背景と現状を解説する。また、最新のツールとプロトコルを紹介する。

Transformation of chloroplast genome - *Chlamydomonas reinhardtii*

Jun Minagawa

Stable chloroplast transformation was first accomplished by *Chlamydomonas reinhardtii* bombardment with high-velocity microprojectiles in 1989. Transformation techniques have been refined, and several selectable markers and reporter genes have been developed. This chapter overviews the history and current situation of chloroplast transformation of *C. reinhardtii*, including the molecular tools and the standard protocols.

2.b.1 背景

多くの高等植物の細胞では細胞あたり100から1000個の葉緑体があるとされるが、クラミドモナスには細胞あたり1個しか存在せず、しかも細胞容量の40-60%を占めるほど細胞内にひろがっている。大きな葉緑体が1個しかないという特長が、クラミドモナスが葉緑体形質転換生物の一番手となる決め手となった。クラミドモナスの葉緑体ゲノムは環状分子で配列は決定されており、そのサイズは203 kbpである¹⁾。葉緑体タンパク質の多くは核ゲノムにコードされているが、光化学系IのPsaA/Bタンパク質や光化学系IIのD1/D2タンパク質など、光合成系の主要なタンパク質は葉緑体ゲノムにコードされている。これらのタンパク質の構造や機能を解析するうえで、葉緑体形質転換系は重要な研究手段となっている²⁾。また、最近では葉緑体工場の名のもと、ヒト抗体ほか有用なタンパク質の発現が次々と試みられている³⁾。

2.b.2 バイオリスティック形質転換

葉緑体遺伝子の発現系は原核生物型であり、導入されたDNAは核ゲノムの場合と異なり相同組換えにより葉緑体ゲノムに組み込まれる。したがって、ジーンターゲットングが可能である。しかし、葉緑体は堅い細胞壁をもつ植物細胞の中にあるだけでなく、二重の包膜に包ま

れているため、葉緑体のストロマに目的のDNAを導入することは容易ではなかった。

葉緑体形質転換系の開発における最も重要な突破口は、BoyntonらとSanfordのグループによって1988年に報告されたクラミドモナスの研究である⁴⁾。彼らは、*atpB* 遺伝子を欠損し光合成的に生育できない変異株をホストに用い、野生型の *atpB* 遺伝子をパーティクルガンで葉緑体に導入し、形質転換体が光独立栄養条件下で生育することを証明してみせたのだ。これに先立つ1984年、植物体の形質転換のために花粉へ遺伝子を導入しようとしていたSanfordは、既存の導入法を試みたがどれもうまくいかず、高エネルギーイオンビームを打ち込んで細胞に穴を開けてみよう、と、極微細加工の専門家Wolfのもとを訪れた。この試みもうまくはいかなかったが、逆にDNAの方を打ち込んでどうかとすすめられ、以後3年をかけてDNAを細胞に打ち込む技術確立したことになる。彼らによって、硬い細胞壁を通過させるためには、1) 柔らかいDNAを硬い粒子に付着させたさえればよいこと、2) 貫通した硬い粒子は必ずしも細胞に死をもたらすわけではないこと、3) 小さな細胞には小さな粒子が有効であること、4) 粒子を減速させないためには真空中で打ち込みを行うと良いことなどが明らかにされた。更に、5) 細胞内に粒子を打ち込むには、“銃”と同様の原理で行うと最も効果があることもわかり、装置をパーティクルガン（粒子銃）と名付け、それによる形質転換をバイオリスティック形質転換^{#1}と呼ぶことにした⁵⁾。

1) 北海道大学低温科学研究所

2.b.3 分子生物学的ツール

初期の研究では、抗生物質耐性を示すリボソーム RNA 遺伝子上の点変異を選択マーカーとして用いた⁶⁾。この場合、別のプラスミド上にコードされた目的の導入遺伝子はリボソーム RNA マーカー遺伝子と同時に葉緑体に導入される (co-transformation)。しかしこの方法はマーカーのみが導入される確率が高いため、現在ではその後に開発された以下のマーカーが広く使われるようになった。

2.b.3.1 薬剤選択マーカー *aadA* カセット

Goldschmidt-Clermont⁷⁾ によって開発された細菌由来のスペクチノマイシン/ストレプトマイシン不活化酵素 (aminoglycoside adenine transferase) 遺伝子 (*aadA*)。5' 側にクラミドモナス葉緑体由来の *atpA* 遺伝子の 5'UTR を、3' 側に *rbcL* 遺伝子の 3'UTR をそれぞれ連結したものが配布されている。*aadA* カセットは葉緑体ゲノム上どこに挿入させることも可能であるが、*aadA* カセット挿入サイトの上流または下流に存在する遺伝子の発現に影響を与える可能性に留意しなければならない。

2.b.3.2 再利用可能な薬剤選択マーカー

483-AAD-483 カセット

aadA 遺伝子をマーカーとして同一株に複数回の遺伝子導入を行うために開発された⁸⁾。*aadA* カセットの前後に全く同じ配列を持つ 483 bp の DNA を連結させたため、その部分で起こる相同組み替えを利用してマーカーをゲノムから排除する (マーカーを失った株を選択する) ことが可能となった。工程としては、一旦選択培地上でスペクチノマイシン耐性をマーカーとしてカセットをゲノム上に組み込ませたのち、スペクチノマイシンを加えない培地に移し薬剤による選択圧を取り除く。前後の 483 bp 配列同士の間で組換えが起き、中心の *aadA* 部位が抜け落ちたスペクチノマイシン感受性株を選抜する。

導入した部位特異的変異や 483 bp 配列はゲノムの挿入部に残るが、スペクチノマイシンには再び感受性となる。こうして、部位特異的変異の導入や遺伝子破壊をさらに加えられるようになった。この方法により、葉緑体ゲノム上の遺伝子操作は何度でも行うことができる。

2.b.3.3 薬剤選択マーカー *aphA-6*

aadA 以後報告されたいくつもの薬剤選択マーカーのうち、Bateman and Purton⁹⁾ によって開発された院内感染菌 *Acinetobacter baumannii* の aminoglycoside phosphotransferase 遺伝子 (*aphA-6*) は、安定したカナマイシン (もしくはアミカシン) 耐性遺伝子として広く使われている。

2.b.3.4 レポーター遺伝子

葉緑体ゲノム遺伝子の発現レポーター遺伝子としては、複数の GFP やルシフェラーゼなどが報告されている (表 1)。高い発現を得るため、ほとんどの場合クラミドモナス葉緑体ゲノム用にコドンバイアスが最適化されている。詳細は原報を参照されたい。

2.b.4 葉緑体形質転換の手順

2.b.4.1 ベクターの作成

ゲノムに挿入する遺伝子の両端に、十分長い葉緑体ゲノム配列を配置した形質転換ベクターを作成する。相同組換え (double crossover event) を効率良く起こすためである。長さは少なくとも 500 bp 程度は必要で、通常は 1 kb 以上を用いる。

2.b.4.2 パーティクルガンによる遺伝子導入

ベクター DNA をマイクロキャリアと呼ばれる微小なタングステンもしくは金粒子 (直径約 1 μ m) に付着させ、これを音速程度に加速させプレート上の細胞に撃ち込む。初めて市販されたパーティクルガンは火薬を使ったものであったが (PDS-1000, デュボン)、その後ガス式の銃が考案された¹⁶⁾。この方式では、DNA を付着させた

表 1: クラミドモナスで利用されるレポーター遺伝子

レポーター遺伝子	発現されるレポーター	文献
<i>uidA</i>	大腸菌 (<i>E.coli</i>) GUS (β -glucuronidase)	10)
<i>gfp</i>	クラゲ (<i>Aequora victoria</i>) GFP	11)
<i>GFPct</i>	クラゲ (<i>Aequora victoria</i>) GFP	12)
<i>rluc</i>	ウミシイタケ (<i>Renilla reniformis</i>) ルシフェラーゼ	13)
<i>luxCt</i>	発光細菌 (<i>Vibrio harveyi</i>) ルシフェラーゼ	14)
<i>lucCP</i>	ホタル (<i>Photinus pyralis</i>) ルシフェラーゼ	15)

^{#1} “バイオリスティック (biolistic)” は、生物学的弾道学 (biological ballistics) を意味する造語。

マイクロキャリアの懸濁液をさらにマクロキャリア（銃で例えれば銃弾に相当する）に付着させる。真空室の天井にマクロキャリアを“装填”した後、ヘリウムガスをラプチャーディスクが破れるまで圧縮し、破れた瞬間の圧力でマクロキャリアをストップングスクリーンに打ち付ける。マイクロキャリアは慣性の法則で細胞に打ち込まれる。マイクロキャリアの大きさはクラミドモナスの十分の一程度なので、‘爆撃’を受けた大半の細胞は、‘絶命’する運命となるが、中には1個程度の‘貫通銃創’を負っても、生命には別状のないものもある。このような細胞では、マイクロキャリアが貫通した際にその表面に付着していた遺伝子が細胞内に残されていることがある。残された遺伝子と葉緑体ゲノム上の遺伝子との間で相対的組換えが行われると、組換え遺伝子が葉緑体ゲノム上に保持される。

2.b.4.3 形質転換体の選択

‘爆撃’後、選択培地上の細胞はゆっくりと死に、緑の色が薄くなりわずかに褐色を帯びてくる。選択マーカーに *aadA* カセットを用いた場合、暗所よりわずかに光が当たる場所に放置したほうが選択マーカーがよく発現する。1-3週間程度で、死んだ細胞の層上に緑の濃いコロニーが現れる(図1)。葉緑体には80コピーのゲノムが含まれるので、最初に生育してきたコロニーでは葉緑体ゲノムが形質転換型になっているわけではなく、野生型のコピーも残る。そこで、得られたコロニーを新しい選択

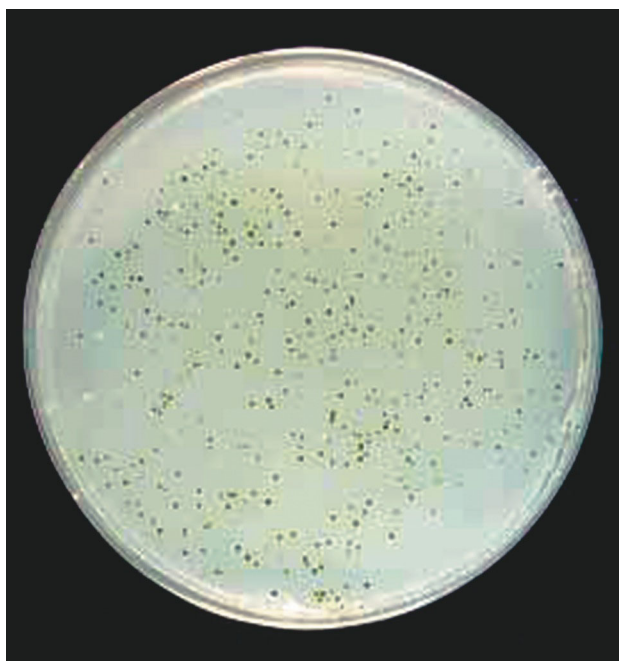


図1：爆撃後2週間たった選択培地上にはこのようにコロニーが現れる。

培地のプレートで1週間程度生育させシングルコロニーを単離する。これを3回程度繰り返すことによって、葉緑体ゲノムのすべてのコピーは完全に形質転換型に変換される。

2.b.5 葉緑体形質転換プロトコル

2.b.5.1 用意するもの

[パーティクルガン]

現在日本で入手可能な2機種と自作の方法について紹介する。

1. PDS-1000/He (Bio-Rad 165-2431, 定価 540 万円)

初期の火薬式の PDS-1000 に替え、ヘリウムガス用に改良されたもの。ラプチャーディスクやマクロキャリアを必要とするなど PDS-1000 時代からのシステムをそのまま引き継いでいる。文献に良く登場するのが利点であるが、装置自体が高価であり、またランニングコストも安価ではない。

2. PIG (自作)

PDS-1000/He で必要となるラプチャーディスクやマクロキャリアは使わず、ヘリウムガスポンペを電磁弁で制御することでマイクロキャリアを発射する。このためパーティクル“インフロー”ガン (PIG) と呼ばれる¹⁷⁾。リレーを用いた簡単な回路によって制御する電磁弁、天井部にフィルターホルダーを取り付けられるようにデザインした真空室、ヘリウムポンペ、真空ポンプとそれに配管部品等を組み合わせて比較的安価に自作することができる(図2, 3)。ランニングコストもほとんどかからず、また PDS-1000/He よりも 10 倍

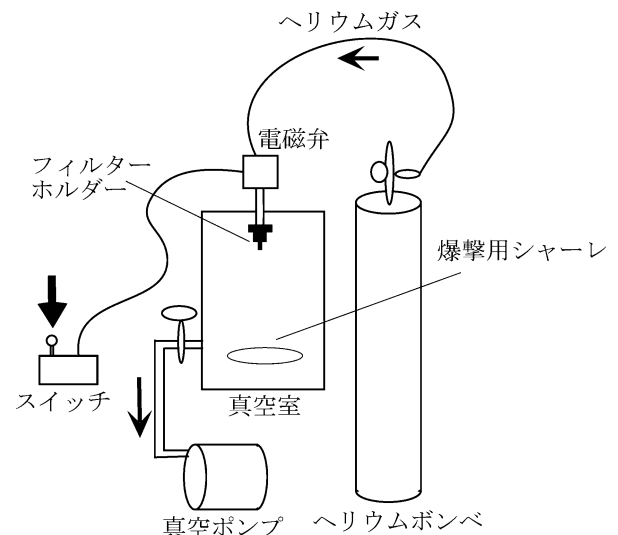


図2：パーティクル・インフロー・ガンの構成

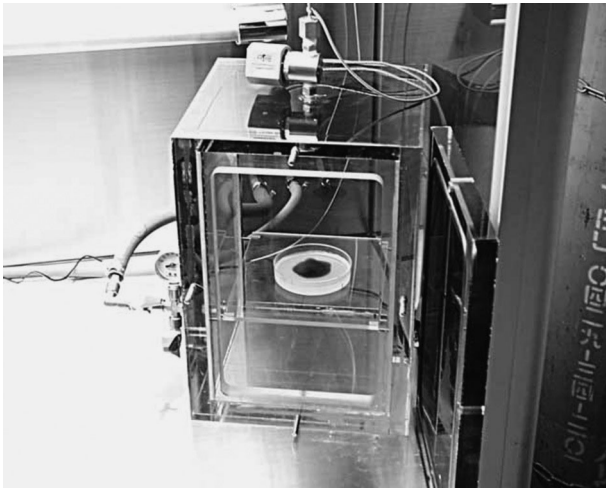


図3：自作したパーティクル・インフロー・ガン

から 100 倍効率が良いとの報告もある。電磁弁制御の方がヘリウムガスを正確にコントロールでき、特に低圧で発射することが可能であるために、サンプルに優しい爆撃ができるためであると考えられている。

3. IDERA GIE-III (株式会社タナカ, 定価 228 万円)
PIG の原理を用いて商品化した国産品。

[マイクロキャリア]

バイオリスティック形質転換では、タングステン粒子あるいは金粒子がマイクロキャリアとして使われる。タングステンは安価でさまざまな粒子径のものが手に入り、DNA もよく結合するが、粒子径の分布が荒い、生物学的に有害であるなどの欠点を持つ。金粒子は均一な粒子径のものが手に入る反面、DNA を結合させにくく、また凝集したりプラスチックの表面に付着するなど取り扱いが難しい。クラミドモナスの葉緑体形質転換においては、ほとんどの研究者がタングステンを使用している。Sanford¹⁸⁾によるとマイクロキャリアの粒子径は細胞の大きさの十分の一程度が目安となるため、長径が 5~10 μm であるクラミドモナスに対しては、通常は 1 μm 径程度のものが選択される。国内で容易に入手できる 2 種を紹介する。

1. タングステン M17 ($\phi 1.1 \mu\text{m}$) (Bio-Rad, #165-2267)
2. B10 ($\phi 1-1.3 \mu\text{m}$) (東京タングステン株式会社)

2.b.5.2 プロトコル

以下のプロトコルは、Boynton et al. (1988) を改変したものである。

1. 2×10^6 cells/ml 程度に生育した宿主株 40 ml を

遠心して集める。

2. 細胞を 0.5 ml 程度の TAP 培地に懸濁し、あらかじめよく乾かした TAP 培地の中央に直径 5 cm 程度の‘水溜り’を作る。クリーンベンチで 2-3 時間乾かす。
3. タングステン粒子約 50 mg をエッペンドルフチューブに量り取る。
4. エタノールを 1 ml 加え、30 秒間ボルテックスして滅菌する。
5. 微量遠心機で遠心してタングステンを沈殿させ、上清のエタノールを捨てる。
6. タングステン粒子を滅菌水 0.5 ml に再懸濁し、30 秒間ボルテックスののち、再度遠心し、上清を捨てる。
7. 6. をもう一度繰り返す。
8. 100 mg/ml になるようタングステン粒子を 25% glycerol 溶液に懸濁する。
9. 以下の順に必要な試薬をマイクロチューブに加える。一つ加えるごとにピペッティングでよく混合する。

滅菌水	7.5 μl
100 mg/ml タングステン懸濁液	7.5 μl
0.3 mg/ml DNA 溶液 ^a	5 μl
2.5 M CaCl_2	12 μl
0.48 M Spermidine	1 μl

^aDNA は Mini-prep 程度の純度の環状プラスミドで良い。
10. 室温で 10 分間静置する。
11. 微量遠心機で 30 秒間遠心し、上清のうち 25 μl を捨てる。
12. エッペンドルフチューブの底に沈殿したタングステンの粒子を残りの 8 μl の溶液にピペッティングでよく懸濁したのち、シリンジホルダー内の金属メッシュの中央に注意深くのせる。
13. 真空チェンバーの空気流入弁を閉じ、真空ポンプへの弁を開け、真空ポンプを起動する。
14. 真空ゲージが 25 inch Hg を指した時点で真空ポンプへの弁を閉じる。
15. ヘリウムガス (6 kg/cm²) の電磁弁を 50 ミリ秒間開放することによってタングステン粒子をプレート上の細胞層に打ち込む。
16. 室温、弱光のもとで 3 時間程度静置したのち約 5 ml の TAP 培地で細胞層を剥ぎ取り、懸濁した上で、選択培地 (通常は 100 $\mu\text{g/ml}$ スペクチノマイシンを添加した TAP 培地) 上にスプレッドする。
17. 10 日前後で現れるコロニーを、白金耳で 8 個程度単離する。
18. 更に約 10 日後、成長した単離コロニーから葉緑体

DNA を Mini-prep (後述のプロトコル参照) する。
19. 適当なプライマーを用いて PCR を行ったのち、該当領域の塩基配列を決定する。

※必要ならばホモプラスミック状態が得られるまで、スプレッド→単離→塩基配列解析を繰り返す。

2.b.6 クラミドモナス葉緑体 DNA の Mini-prep プロトコル

大腸菌からプラスミド DNA を抽出する手法をほぼそのまま踏襲する。キアゲン社の QIAquick plasmid mini-prep kit を用いて行う例を紹介するが、陰イオン交換カラムがなければフェノール処理等でも実用上問題は無い。

1. 2 週間程度培養した TAP 培地上から、白金耳の先のループに載る程度のコロニーをすくい取る。
2. エッペンドルフチューブにあらかじめ 0.25 ml の P1 溶液 (50 mM Tris. HCl, 10 mM EDTA, 1 mg/ml RNaseA, pH 8.0) を入れておき、1 ですくったコロニーをそこに懸濁する。よく懸濁しにくい場合は適宜超音波処理等を行う。
3. P2 溶液 (0.2 M NaOH, 1 %SDS) を 0.25 ml 加え、細胞を可溶化する。
4. N3 溶液 (主成分酢酸) を 0.35 ml 加え、数秒ボルテックスによって攪拌する。
5. 12000 rpm, 5 分間遠心する。
6. 上清を付属の陰イオン交換カラムにロードし、12000 rpm, 1 分間遠心する。
7. リザーバーに受けたフロースルーを捨て、以下、0.5 ml PB 溶液, 0.75 ml の PE 溶液の順でカラムを洗浄する。
8. 3 分間 12000 rpm で遠心し、カラム上のメンブレンを乾かしたのち、30 μ l の精製水で 1 分間インキュベーションすることにより DNA を抽出する。これらの DNA は制限酵素処理, PCR 等にそのまま使える。

参考文献

- 1) J. E. Maul, J. W. Lilly, L. Cui, C. W. dePamphilis, W.

- Miller, E. H. Harris, & D. Stern, *Plant Cell* **14** (2002) P. 2659.
- 2) L. Xiong, & R. T. Sayre, *Photosynth. Res.* **80** (2004) P. 411.
- 3) S. P. Mayfield, A. L. Manuell, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto, & J. Marin-Navarro, *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (2007) P.126.
- 4) J. E. Boynton, N. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark, & J. C. Sanford, *Science* **240** (1988) P.1534.
- 5) J. C. Sanford, *Trends Biotechnol.* **6** (1988) P.299. ※バイオリスティック形質転換発明のいきさつが書かれている。
- 6) S. M. Newman, N. W. Gillham, E. H. Harris, A. M. Johnson, & J. E. Boynton, *Mol. Gen. Genet.* **230** (1991) P.65.
- 7) M. Goldschmidt-Clermont, *Nucl. Acids Res.* **19** (1991) P.4083.
- 8) N. Fischer, O. Stampacchi, K. Redding, & J. -D. Rochaix, *Mol. Gen. Genet.* **251** (1996) P.373.
- 9) J. M. Bateman, & S. Purton, S., *Mol. Gen. Genet.* **263** (2000) P.404.
- 10) W. Sakamoto, K. L. Kindle, & D. B. Stern, *D. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993) P.497.
- 11) Y. Komine, E. Kikis, G. Schuster, & D. Stern, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002) P.4085.
- 12) S. Franklin, B. Ngo, E. Efuet, & S. P. Mayfield, *Plant J.* **30** (2002) P.733.
- 13) I. Minko, S. P. Holloway, S. Nikaido, M. Carter, O. W. Odom, C. H. Johnson, & D. L. Herrin, *Mol. Gen. Genet.* **262** (1999) P.421.
- 14) S. P. Mayfield, & J. Schultz, *Plant J.* **37** (2004) P.449.
- 15) T. Matsuo, K. Onai, K. Okamoto, J. Minagawa, & M. Ishiura, *Mol. Cell Biol.* **26** (2006) P.863.
- 16) J. C. Sanford, M. J. Devit, J. A. Russell, J. F. D. Smith, P. R. Harpending, M. K. Roy, & S. A. Johnston, *Technique* **3** (1991) P.3.
- 17) J. J. Finer, P. Vain, M. W. Jones, & M. D. McMullen, *Plant Cell Rep.* **11** (1992) P.323.
- 18) J. C. Sanford, F. D. Smith, & J. A. Russell, *Methods in Enzymology* **217** (1993) P.483. ※バイオリスティック形質転換の応用についてまとめるとともに、最適化へのヒントを数多く含む。